

高速液体クロマトグラフィー（低圧） （H P L C） 操作手順書

横浜国立大学機器分析評価センター

作 成 日	2021 年 10 月 27 日	
手順書 No.		
作 成	承 認	

目次

A	装置の起動	- 3 -
	（装置起動）	- 3 -
	（ページ操作）	- 6 -
	（カラムの接続）	- 7 -
	（カラムの洗浄方法）	- 8 -
B	測定	- 9 -
	（メソッドファイルの作成）	- 9 -
	（サンプルテーブルの作成）	- 13 -
	（オートサンプラーの用意）	- 16 -
	（データ収集の実行）	- 19 -
	（試料の注入）	- 21 -
	（データ解析）	- 22 -
	（装置の停止）	- 22 -

【著作権・免責】

本マニュアルの著作権は、『横浜国立大学 研究推進機構 機器分析評価センター』に帰属します。

- 本マニュアルの**印刷およびダウンロード**につきましては、当該設備の利用者および利用予定者に限り認めます。**オンライン上での閲覧**についての制限はございません。
- 登録から抹消された利用者は、印刷またはダウンロードしたファイルを破棄してください。
- 著作権および免責につきましては、こちらの URL
(https://www.iac.ynu.ac.jp/site_policy) にて詳細が記載されています。

A 装置の起動

※ 新しいカラムや1週間以上使用していないカラムを使う場合は、使用する水または有機溶媒（溶剤:水=95:5 など）を 0.1 mL/min 程度のポンプ流量で流し、カラムを一晩洗浄してから分析を行ったほうが良い。溶媒を変更する場合も洗浄した方が良いことがある。

（装置起動）

A-1 使用する溶媒の確認を行う。ミリ Q 水は長期間（数日程度）使用していない場合は交換する。

注意！ 使用を許可している溶媒は、水、アセトニトリル、メタノールの3種類である。それ以外の溶媒を使うときは担当者に相談すること。

注意！ 溶媒は HPLC 用または LCMS 用を用いる。また、水はミリ Q 水を用いる（センターの 208 号室に装置がある）。

注意！ 瓶出しの溶媒は、メンブランフィルターでろ過しておくこと。ろ過キットはセンター用意されているので、使用する場合は担当者に相談すること。

注意！ 新しく入れ替えた場合や、長期間使用していない場合は、超音波洗浄機に 15 分程度かけて脱気を行うこと。

A-2 装置の主電源を ON にする。（カバーを開けてスイッチを入れる）



A-3 UV検出器、ポンプ、カラムオーブンのそれぞれの電源をONにする。(順不同)

※ 自動で1分程度イニシャライズが行われる。

A-4 オートサンプラーを使うときは、電源を入れる。

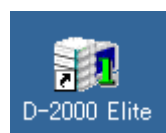
※ このオートサンプラーは、PCで制御できないモデルとなっている。



A-5 検出器を安定させるため、測定までに電源を付けてから30分～1時間待つ。

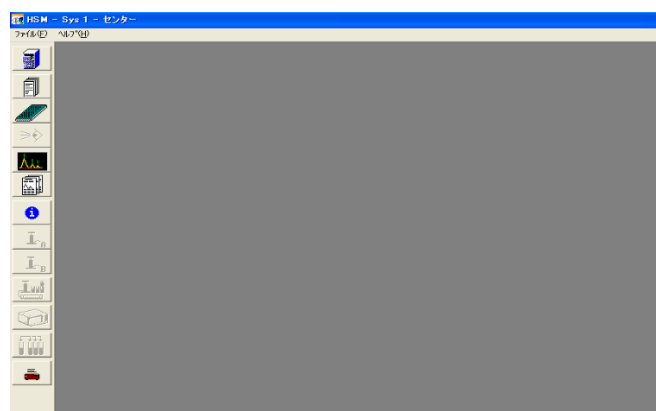
※ この間、測定の準備作業は行ってよい。


A-6 ノートパソコンとHPLCがUSBケーブルで繋がっているか確認し、電源をONにする。



A-7 D-2000 Eliteのアイコンをダブルクリックする。

※ 以下、D-2000 Eliteの左サイドバーにある、いくつかのアイコンを使って作業する。



- A-8 モジュール状態確認  のアイコンをクリックしてモジュール状態ウィンドウを開く。**イニシャライズ**をクリックし、以下のようにユニットIDが表示されるまで待つ。オートサンプラーはPCで認識しないので、表示されなくて問題はない。



モジュール		プログラムNO	シリアルNO
インターフェース:	IFB	8918190-00	
ポンプA:	L-2130	8908110-08	21H72-078
ポンプB:			
オートサンプラ:			
オーブン:	L-2350	8908150-01	2164-009
検出器Ch1:	L-2400	8908140-05	21J14-010
検出器Ch2:			
付属装置:			

Buttons: **イニシャライズ**, 接続解除(D), OK

- A-9 移動相に用いる溶媒の準備をする。チューブ A、B はシステムで表示されるポンプ A、B に対応しているので、間違えないように選んだ溶媒の中にチューブの先端を入れる。通常は、A が水、B が有機溶媒となっている。オートサンプラーに繋がっている洗浄液用のチューブは、試料が溶解する適当な洗浄液に入れる。A,B 溶液で対応できなければ、別途洗浄液を用意して使用する。

- ※ キャップは GL45 規格となっているが、径が合わない場合は径違いを取り付ける。
- ※ 溶媒が枯れると、気泡が入ってカラムや検出器に不具合を生じさせる可能性がある所以、十分な量を入れておくこと。
- ※ ろ過などで溶媒の浮遊物を除去していない場合は、溶媒フィルター（トラップ）を付けておくこと

- A-10 廃液ビンにチューブが接続されているか、一杯になっていないか、確認する。



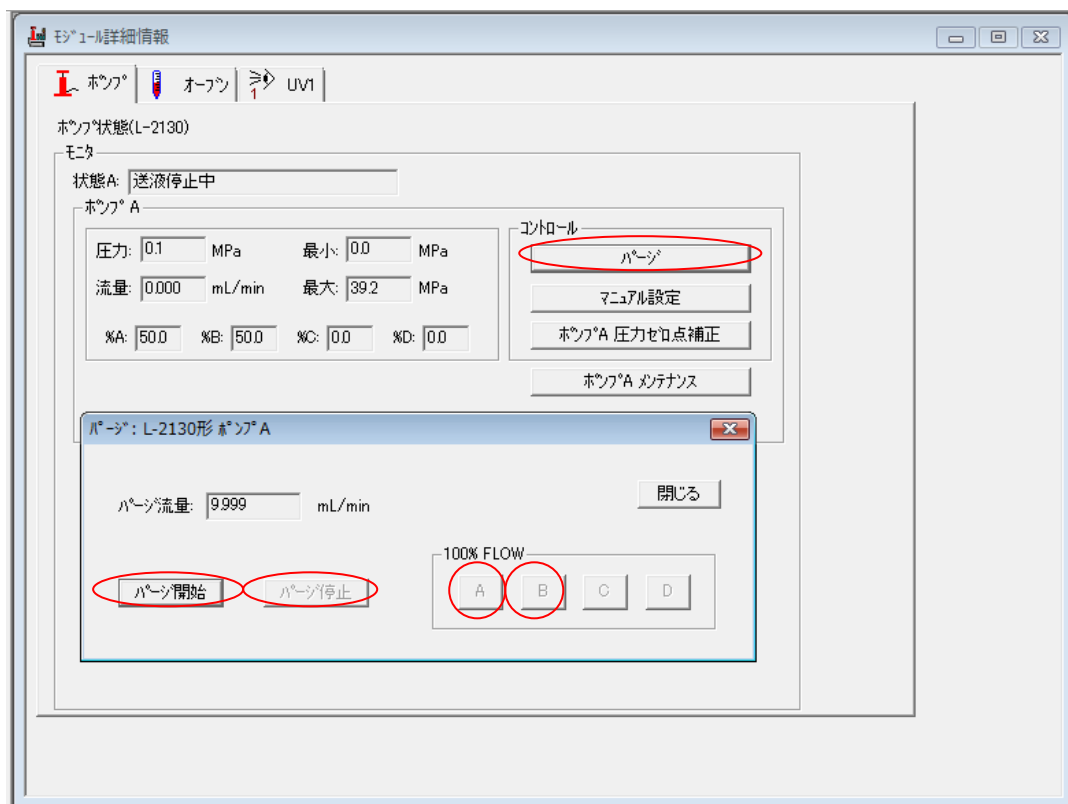
(パージ操作)

A-11 装置を概ね数日間以上使用していなかった場合は、経路のパージ作業を行う。(毎回行ってもよい。)

A-11-1 装置のポンプのドレインバルブを左（反時計回り）に回して1～2周程度開く。



A-11-2 モジュール詳細情報  のアイコンをクリックして開く。




A-11-3 ポンプのタブの「パージ」をクリックして開く。

A-11-4 「パージ開始」を押すと予め設定されている溶媒比の条件でパージが開始される。「A」または「B」を押すと一方の溶離液が100%の比率になるので、それぞれを押して交互にパージすると効率がよい。流路の気泡が消えるまで1分～5分程度パージをしたら「パージ停止」を押し、パージを止める。

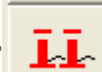
A-11-5 「パージ停止」を押し、ポンプのFLOWが0になったらポンプのドレインバルブを右（時計回り）に回して閉める。

※ FLOWが0になる前にバルブを閉めると、ポンプ圧が高まってエラー停止することがある。

(カラムの接続)

A-11-6 モジュール詳細情報  のアイコンをクリックして開く。マニュアル設定を開き、流量を小さめ(0.05～0.2mL/min程度)に設定しておく。

- A-11-7 カラムオープンの扉を開け、配管を繋げているユニオンをレンチで外す。レンチはサイズの合ったものか、またはモンキーレンチを用いる。

- A-11-8 ポンプ  を ON にして、気泡が入らないように注意しながら下部（ステンレス配管側）からカラムを取り付ける。このとき、移動相は下から上に流れるので、カラムの送液方向に注意すること。

- A-11-9 カラムの上端に液が上がってきたら、カラムの上部（テフロン配管側）も接続する。



（カラムの洗浄方法）

- A-12 カラムを洗浄する手順は、規格サイズや用途によって異なる。詳しくは、カラムの説明書を参考とするか、または管理者に相談すること。

- ※ リン酸などのバッファを使う場合は、析出に注意すること。リン酸は有機溶剤で析出してしまうので、使用する場合は十分に水で洗い流してから有機溶剤に置換する必要がある。
- ※ ほとんどのカラムは塩基性に弱いので、耐塩基性のスペックに注意すること。
- ※ 逆相カラムは水系で保管すると劣化が進みやすいので、長期間保存するときは有機溶剤系で置換することが多い（マニュアルに保管方法について記載があることが多いので、それに従うこと）

B 測定




- B-1 アプリケーションの選択  のアイコンを開き、予め作成している研究室名を選択する。

(メソッドファイルの作成)

- B-2 以下の手順で分析条件（メソッドファイル）を設定する。



- B-2-1 分析ファイル設定  アイコンをクリックし、ファイルオープンウィンドウを開く。




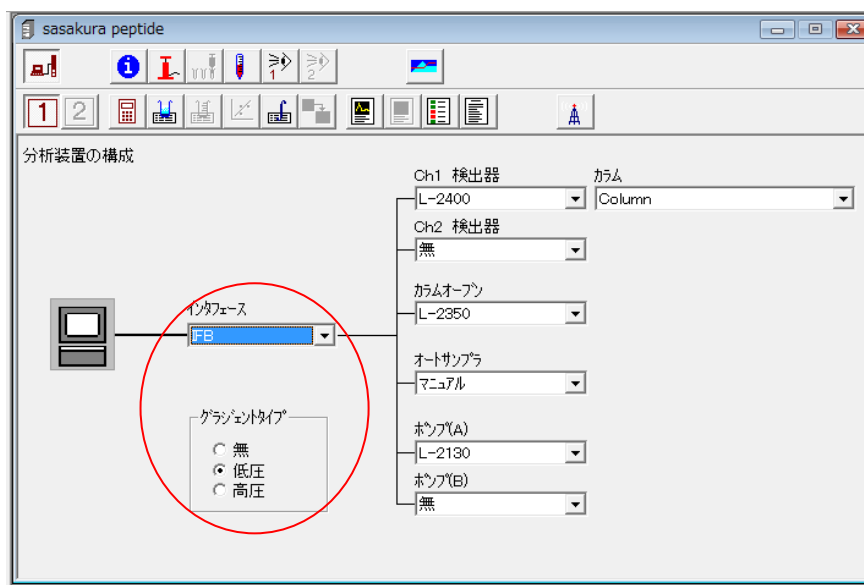
既存の分析ファイルのパラメータ変更を行う場合は“ファイルオープン”のリストから適当なファイルを指定し、**OK**を押す。

※ 一方、分析ファイルを新規に作成し、パラメータ設定を行う場合は、上記の方法ではなく以下の操作に従う。


1. “ファイル”メニュー中の“新規作成”をクリックする。
2. “新規”ダイアログの“分析ファイル”を指定し、OKボタンを押す。

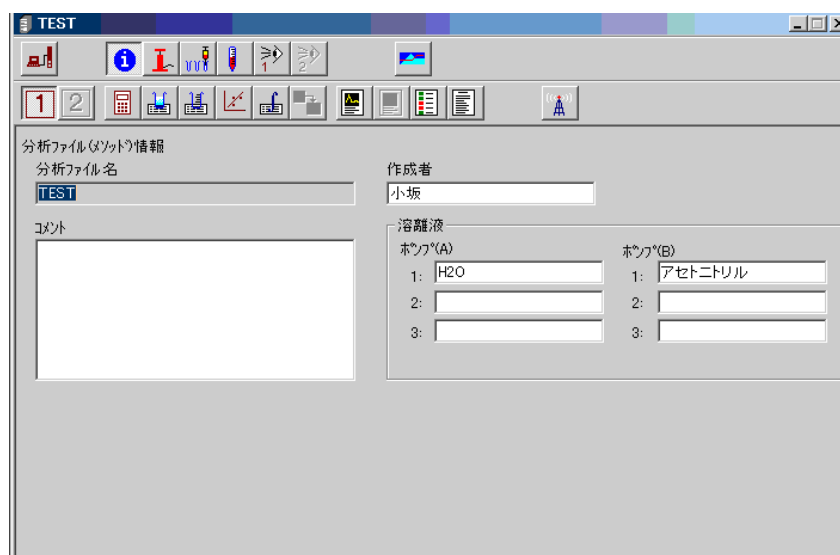
- B-2-2 分析ファイル情報を表示するウィンドウが表示される。

B-2-3 分析装置の構成  アイコンをクリックし、分析装置の構成を以下のように設定する。



インターフェースは「I F B」、グラジエントタイプは「低圧」に設定する。

B-2-4 モジュール情報  アイコンをクリックし、作成者、溶離液などを入力する。



B-2-5 ポンプアイコン  をクリックし、ポンプの送液条件を設定する。

TEST

ポンプパラメータ (L-2160U, L-2160U)

圧力リミッタ

全ポンプ 下限 上限
0.5 60.0 MPa

溶離液

ポンプ(A) ソルベントセクタ 1
1: H2O
2:
3:

ポンプ(B) ソルベントセクタ 1
1: アセトニトリル
2:
3:

時間 (min)	時間 (min)	%A	%B	流量 (mL/min)	接点出力1	接点出力2	ポンプ(A) 接点出力3
0.0	0.0	100.0	0.0	0.500			
5.0	5.0	50.0	50.0				

圧力リミッタ：


上限→カラムの上限圧力を入力する。

装置の流路の最大圧力は 40MPa であるが、カラム耐圧の条件も超えない設定にする。セル（カラムの出口以降）の耐圧がかなり低いので、カラムや抵抗管を接続していない場合は、圧力リミッタも低い値（数 MPa）に設定する必要がある。

下限→ゼロより大きい数字にすると、配管からもれなどが起こった時に自動的にポンプが停止する。

グラジエント条件： 時間(min)と%A（A 溶離液の割合）でグラジエント条件を設定する。%B は自動計算されるので入力の必要はない。


※ %A を急に変化させたいときは、時間を 0.1 分加えた行を追加して設定する。

※ グラジエント条件を図で確認したい場合は、のアイコンをクリックして表示する。

流量： カラムや分離条件に適した流量を設定する。


※ 複数の条件設定を加える場合は、空白になっている項目（%A や流量な

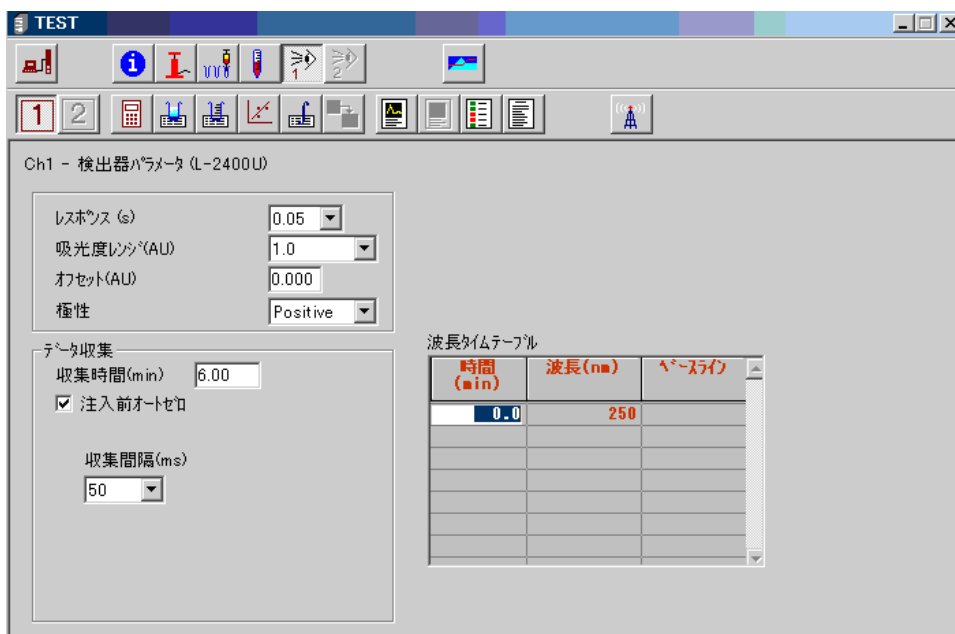
ど) があると、一つ前の行と同じ設定になる。

B-2-6 オートサンプラーは外付けのため、PC では制御できない。オートサン
プラーアイコンは使用できないので、本体の方で操作すること。

B-2-7 オープンアイコンをクリックし、温度条件を設定する。

※ カラム温度の下限と上限は、使用するカラムの仕様書参照。

B-2-8 Ch1-検出器アイコンをクリックし、パラメータを設定する。細
かい条件は、メーカーのオペレーションマニュアルを参考にすること。



TEST

Ch1 - 検出器パラメータ (L-2400U)

レスポンス (s) 0.05
吸光度レンジ (AU) 1.0
オフセット (AU) 0.000
極性 Positive

データ収集
収集時間 (min) 6.00
☒ 注入前オートゼロ
収集間隔 (ms) 50

波長タイムテーブル

時間 (min)	波長 (nm)	ゲイン
0.0	250	

- ・ レスポンス(s) : 0.05 が通常。小さいほどクロマトグラムの分解能が良くなり、大きいほどノイズが低減される (相互関係)。
- ・ 収集時間(min) : 1 回の測定で検出器を作動させる時間。通常は測定時間と同じ時間を入れるが、データの収集をせずにカラム安定化時間を入れる場合などは短くする。
- ・ 収集間隔(ms) : 50 が通常。収集間隔が長いほど信号強度が大きくなるが、クロマトグラム分解能が悪くなる。定量分析する場合は、検出器の検出上限にも注意。

- ・ 波長は測定する試料によって変える。試料に吸収がある波長を設定する。設定可能な領域は 200nm～600nm。

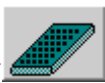
B-2-9 以上の設定が終了したら、“ファイル”メニュー中の“メソッド名変更し保存”をクリックする。

※ 上書きする場合は注意。

(サンプルテーブルの作成)

B-3 以下の手順でオートサンプラー条件（サンプルテーブル）を設定する。


B-3-1 既にあるサンプルテーブル内容を修正して測定する場合は、サンプル

テーブル設定アイコン  をクリックし、適当なファイルを選択する。

※ 新規にサンプルテーブルを作成する場合は

- ① “ファイル”メニュー中の“新規作成”をクリックする。
- ② “新規”ダイアログの“サンプルテーブル”を指定し、OKボタンを押す。

B-3-2 テーブルの作成は以下の 2 通りのモードがある。どちらを使ってもよい。

① 一括入力モード 

各パラメータを設定し、テーブル／マップへ追記ボタンをクリックすると、1 行ずつテーブルが自動作成される。

ファイル名など、より詳細に変更したい場合は、下記の個別入力モードで編集もできる。

サンプルテーブル名: TEST

ラック名: STD

テーブル設定条件

分析ファイル名: TEST

カラム平衡化時間(min): 0

許容最大ノイズ: Ch1 8000, Ch2 8000

許容最大ドリフト: Ch1 30000, Ch2 30000

☐ ブランクを取る

注入回数: 1

☒ 検量線を作成する

☒ STDバイアル位置を固定

検量線のレベル数: 2

各STDの注入回数: 1

サイクル中のUNK数: 2

STD/UNKのサイクル数: 1

STD共通名: 標準試料

UNK共通名: 未知試料

各UNKの注入回数: 1

注入量(μL): 5.0

最初のバイアルNO: 195

バイアル総数: 1

ラックパラメータ

テーブル/マップの消去

テーブル/マップへ追記

ファイルからの転入

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
11										
21										
31										
41										
51										
61										
71										
81										
91										
101										
111										
121										

- ✓ テーブル全体の設定を保存するファイル名となる「サンプルテーブル名」を入力。
- ✓ 分析ファイル名には、設定したメソッドファイルをプルダウンメニューから選択（同一アプリケーションに置かれたファイルのみ表示）。
- ✓ カラムの平衡化まで一定時間待つ場合は、「カラム平衡化時間(min)」にその時間を入力。
- ✓ ノイズテストを行う場合は、「許容最大ノイズ」、「許容最大ドリフト」値を入力。ノイズ 8000、ドリフト 30000 に設定するとノイズテストを行わない設定になる。
- ✓ ブランク測定を行う場合は「ブランクを取る」にチェックを入れる。
- ✓ 右側の設定の多くは検量線に関するものであり、定量分析を行う場合は「検量線を作成する」にチェックを入れて、各値を設定する。（詳細は別途）

② 個別入力モード

テーブル編集アイコンをクリックして、試料テーブルの設定を個別に行う。

- ※ テーブルを選択して削除したい場合は、マウスかタッチパッドのクリック&ドラッグで下に引くと行がハイライトされて選択できるので、必要な行数を選んだ状態でメニューの編集－「1行削除」で実施できる

(オートサンプラーの用意)

B-4 以下の手順でオートサンプラーの準備を行う。

※ マニュアルインジェクターについては、外してあるので使用できないが、配管を繋ぎ直せば使用可能である。どうしてもという場合は担当者に相談すること。

B-4-1 マイクロプレートにサンプルを入れて用意する。

※ 通常設定では、96 穴マイクロプレート仕様となっている。サンプルチューブの仕様に変更するときは、担当者に相談すること。

※ プレートによってサイズに若干の誤差がある。適合するかどうかは担当者が調べるので、必ず事前に相談すること。

※ 有機溶剤を使って揮発性が気になるときは、専用のフィルムなどを用意するとよいこともある。

B-4-2 サンプルラックを取り出すときは、上に軽く持ち上げると手前に引き出せる。冷却ラックのため、低温時は結露水が駆動部（モーター）に飛散しないように注意して扱うこと。

B-4-3 サンプルラックに予め設定されているマイクロプレートを設置し、順番と向きに注意して入れる。

※ マイクロプレートは同時に 3 枚入れることができる。後で使用するラックコード (**RACK**) は以下のようにになっている。細かい仕様については、「マニュアル 3-21 ページ」に記載がある。

【96 穴マイクロプレート】	ラックコード 11 :	奥側
12×8 = 96	ラックコード 12 :	中央
	ラックコード 13 :	手前側

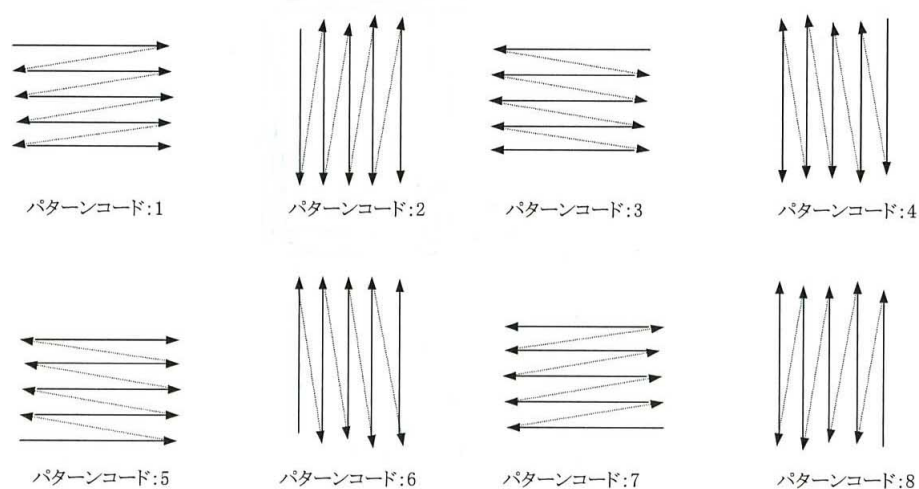


図 3-6 パターンコード

注 : ラックパラメータの X1(バイアル 1(左上)の X 座標)、Y1(バイアル 1(左上)の Y 座標)、X2(バイアル 2(右下)の X 座標)、Y2(バイアル 2(右下)の Y 座標)は、図 3-5 に示す座標位置によって決定されます。
実際に分析するバイアル(VIAL)の順番は、ラックパラメータのパターンコードの種類を選択することによって、変更することが可能です。

B-4-4 ラックパラメータを確認する。

UTILITY → **2** → ラックコード → **1** →

XYZ の設定が順番に出るので、「マニュアルの表 3・1」ラックパラメータ表を参照して誤りがないか確認する。

B-4-5 シーケンシャルプログラムを設定する。

初期画面 (IDLE 状態)

STEP	RACK	VIAL	VOL(μL)	INJ	TIME	[1]
1	1	1	10.0	1/1	0.0	

↓ PROG

EDIT MODE (MODIFY=0, NEW=1)	既存のシーケンシャル プログラムを使うか、 新規に作成するかを選択する。
0	

↓ 編集の場合 : 1 ENT 新規の場合 : 0 ENT

STEP	RACK	VIAL	VOL(μL)	INJ	TIME	[1]
1	_1	1	10.0	1	0.0	

↓ ラックコード ENT

STEP	RACK	VIAL	VOL(μL)	INJ	TIME	[1]
1	1	_1-1	10.0	1	0.0	

↓ 最初のバイアル番号 ENT

STEP	RACK	VIAL	VOL(μL)	INJ	TIME	[1]
1	1	1-_1	10.0	1	0.0	

↓ 最後のバイアル番号 ENT

STEP	RACK	VIAL	VOL(μL)	INJ	TIME	[1]
1	1	1-1	_10.0	1	0.0	

↓ 注入量(μL) ENT

STEP	RACK	VIAL	VOL(μL)	INJ	TIME	[1]
1	1	1-1	10.0	_1	0.0	

↓ 注入回数 ENT

STEP	RACK	VIAL	VOL(μL)	INJ	TIME	[1]
1	1	1-1	10.0	1	_0.0	

↓ サイクルタイム(min) ENT 分析時間 +0.5min に設定する

STEP	RACK	VIAL	VOL(μL)	INJ	TIME	[1]
2	-					

↓ ESC もし、STEP2 の設定が必要なら ESC ではなく続けて入力する

※ シーケンシャルプログラムを編集したときに、余計な STEP があった場合は、**DEL** キーで削除して **ENT** とすること。

※ シーケンシャルプログラムに新しい STEP を挿入したい場合は、**INSERT** キーで挿入することができる。


※ シーケンシャルプログラムの設定を確認するときは、**PROG** キーを押した後に、**▽** **△** キーで表示することができる。戻るときは **ESC** キー。

B-4-6 IDLE モードに戻っていることを確認する。この状態にしておけば、パソコンで分析開始をすると自動的に測定が始まる。


B-4-7 サンプルを用意する。マイクロプレートのラックの順番を間違えないようにオートサンプラーにセットする。

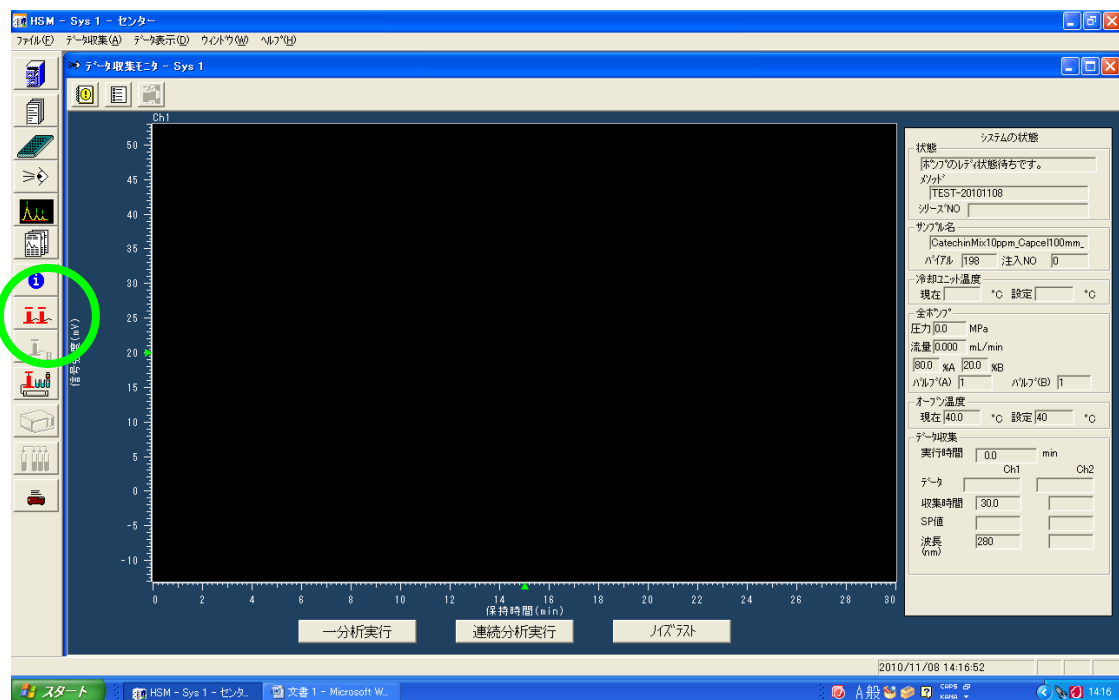
(データ収集の実行)

B-5 以下の手順でデータの収集を行う。

B-5-1 データ収集アイコン  をクリックする。

B-5-2 先ほど作ったサンプルテーブルファイルを選択する。

B-5-3  をクリックしてポンプをオンにする。



B-5-4 ベースラインが安定するまで待つ。

- ※ ベースラインが安定するまでの時間は、装置やカラムの状態に依存する。時間をおいても安定しない場合は、対策がいくつかあるので、状況に応じて対応する。(詳細は別途)

B-5-5 測定前にノイズテストを行う場合は、ノイズテストボタンを押す。(しない場合は押さなくてよい。) 標準では、ノイズとドリフトの値が二桁以下になると安定している。

B-5-6 ノイズテストの左にある一分析実行(サンプルが一つするとき)または連続分析実行(サンプルが複数のとき)をクリックする。

- ※ 一分析実行は、サンプルテーブルに多数入力しても、最初の1行目だけ測定する
- ※ 連続分析を途中で止める場合は、○○をクリックする。

~~—(試料の注入)—~~

~~B-6—以下の手順で試料を注入する。~~



~~B-6-1—廃液瓶をドレインポートに用意しておく。~~

~~B-6-2—「レオダイン用」のニードルが取り付けられたシリンジを用意する。
また、サンプルループの容量に合わせて、注入する量に適切なものを使用する。~~

~~—【全量注入】：— サンプルループの 4~5 倍の液量を入れ、溢れさせる。~~

~~—[欠点] 容量を変えるには、サンプルループの交換が必要。~~

~~—【部分注入】：— シリンジの目盛りから容量を読み取る。~~

~~—[欠点] シリンジ誤差があり、再現性に影響がある。~~

~~B-6-3—シリンジにサンプルをはかり取り、逆さまにして少し吐き出して、空気を完全に抜いておく。(注入量は前項参照)~~

~~B-6-4—インジェクターバルブが INJECT の状態であることを確認し、注入ポートの奥まで差し込み、バルブを素早く LOAD に切り替える (遅すぎると、圧力が上がり装置が止まってしまう)。~~

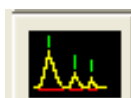
~~B-6-5—シリンジのサンプルをゆっくり押し出し、シリンジを抜かずに、バルブを素早く INJECT に切り替える。~~

~~B-6-6 シリンジを抜き取り、次のサンプルを入れるまで動かさない。~~

~~B-6-7 洗浄液をシリンジに適量取り、バルブを INJECT のまま、シリンジを差し込み、洗浄液を押し出す。~~

(データ解析)

B-7 以下の手順でデータの解析を行う。



B-7-1  をクリックして、データを確認する。

B-7-2 以降、詳細は装置マニュアルを参照。

(装置の停止)

B-8 以下の手順で装置を停止する。

B-8-1 モニタを閉じる。

B-8-2 ポンプが稼動していたら、 をクリックしてポンプをとめる。

B-8-3 カラムを取り外すときは、別のカラムと交換するか、ダミーカラムと取り付ける。

B-8-4 ソフトウェアを閉じる。

B-8-5 パソコンをシャットダウンする。

B-8-6 ポンプ、UV検出器、カラムオーブンのそれぞれの電源を OFF にする。
(順不同)

B-8-7 装置の主電源を OFF にする。

B-8-8 使用記録を記録簿につける。